

なお、スーパバイナリーベクターに匹敵する

か、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。ま

た、スーパバイナリーベクターと遠心処理法を用す

ることにより、より一層効率を向上させることが可能で

ある。さらに、遠心処理法を用いることにより、これま

各品種	培養面積 (cm^2/ml)	無処理	遠心処理度	
			760 g	8,500 g
コシヒカリ	1×10^6	3/10(±)	8/10(±)	7/10(++)
	1×10^6	3/10(±)	0/10(±)	7/10(++)
	1×10^6	4/10(±)	3/10(±)	9/10(++)
	1×10^6	1/10(±)	0/10(±)	7/10(++)

遠心処理時間：10分、共存培養期間：3～5日、Q5陽性 ※【0042】

未熟胚数/供試未熟胚数

()内は胚数におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

各品種	培養面積 (cm^2/ml)	無処理	遠心処理度	
			760 g	8,500 g
コシヒカリ	1×10^6	4.8%(1/21)	0.0%(0/22)	15.0%(5/20)
	1×10^6	4.3%(1/23)	4.5%(1/22)	18.7%(5/10)
	1×10^6	0.0%(0/21)	0.0%(0/22)	14.3%(3/21)
	1×10^6	0.0%(0/23)	0.0%(0/21)	0.0%(0/22)

耐性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数、2次選 ★【0043】

最終了時調査

遠心処理時間：10分、共存培養期間：3～5日 ★

各品種	培養面積 (cm^2/ml)	無処理	遠心処理度	
			760 g	8,500 g
コシヒカリ	1×10^6	0.0%(0/11)	0.0%(0/11)	30.0%(5/10)
	1×10^6	0.0%(0/11)	9.1%(1/11)	27.3%(3/11)
	1×10^6	0.0%(0/10)	0.0%(0/13)	8.1%(1/11)
	1×10^6	0.0%(0/11)	0.0%(0/11)	45.5%(5/11)

耐性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数、2次選 ☆【0044】

最終了時調査

遠心処理時間：10分、共存培養期間：3～5日 ☆

各品種	培養面積 (cm^2/ml)	無処理	遠心処理度	
			10分	30分
コシヒカリ	1×10^6	0.0%(0/11)	9/10(++)	10/10(+++)
	1×10^6	0.0%(0/11)	10/10(+++)	10/10(+++)
	1×10^6	0.0%(0/11)	10/10(+++)	10/10(+++)
	1×10^6	0.0%(0/11)	10/10(+++)	10/10(+++)

遠心処理度：20,000g、供試品種：コシヒカリ Q5陽性 ※【0045】

未熟胚数/供試未熟胚数

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

各品種	培養面積 (cm^2/ml)	無処理	遠心処理度	
			10分	30分
コシヒカリ	1×10^6	0.0%(0/31)	34.3%(10/29)	53.3%(16/30)
	1×10^6	0.0%(0/32)	54.1%(10/23)	56.3%(17/30)
	1×10^6	0.0%(0/31)	20.0%(1/5)	40.0%(12/30)
	1×10^6	0.0%(0/32)	48.0%(17/35)	53.3%(10/30)

遠心処理度：20,000g、共存培養期間：3～5日、2次選後 ※【0046】

最終了時調査

耐性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数 ※

()内は胚数におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

各品種	培養面積 (cm^2/ml)	無処理	遠心処理度	
			10分	30分
コシヒカリ	1×10^6	0.0%(0/31)	34.3%(10/29)	53.3%(16/30)
	1×10^6	0.0%(0/32)	54.1%(10/23)	56.3%(17/30)
	1×10^6	0.0%(0/31)	20.0%(1/5)	40.0%(12/30)
	1×10^6	0.0%(0/32)	48.0%(17/35)	53.3%(10/30)

供試品種：LBA4404/pGZ17m、遠心処理時間：60分

1) 装置高速遠心機 2) 大型高速遠心機 3) 超高速遠心機

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

耐性カルスの出現した未熟胚数/供試未熟胚数 ※

()内は胚数におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

胚数領域におけるQ5発現領域の面積 -：なし、+

小、++：中、+++：大 ※

各種選心 処理	各種選心 期間	未熟胚数			
		胚型におけるQIS発現頻度			
		—	±	+	++
無処理	3日間	5	4	1	0
	6日間	0	6	2	2
	13日間	0	5	2	3
2000 ¹⁾	3日間	0	2	6	3
	6日間	0	1	3	9
	13日間	0	1	3	6
4000 ¹⁾	3日間	0	1	7	2
	6日間	0	0	6	2
	13日間	0	1	5	4

供試胚系：LB4404/pIG211b、1)培養高選選心機 2) ※+1/8-1/4, ++>1/4
大型高選選心機 [0048]

それ、その回数に對し、60分間の選心処理
胚細胞に占めるQIS発現領域の割合 -なし、±<1/8、※20 後のQIS発現(品種:コシヒカリ)

各種選心 処理	各種選心 期間	未熟胚数			
		胚型におけるQIS発現頻度			
		—	±	+	++
無処理	3日間	7	3	0	0
	6日間	3	1	0	0
	13日間	1	6	2	1
2000 ¹⁾	3日間	0	0	1	9
	6日間	0	0	2	8
	13日間	0	0	1	9
4000 ¹⁾	3日間	1	0	4	8
	6日間	0	0	0	10
	13日間	0	0	1	9

供試胚系：LB4404/pIG211b、1)培養高選選心機 2) ※+1/8-1/4, ++>1/4
大型高選選心機 [0049]

それ、その回数に對し、60分間の選心処理
胚細胞に占めるQIS発現領域の割合 -なし、±<1/8、※40 種の月の光

各種選心 処理	供試未熟胚数	圃化数	QIS発現数	形質転換効率
無処理	60	17	12	24.0%
選心処理	150	60	54	36.0%

選心処理:20KG-60分 共存培養5日間
[0050]

[表10] LB4404(pIG211b)による形質転換結
果 (品種:月の光)

各種選心 処理	供試未熟胚数	圃化数	QIS発現数	形質転換効率
無処理	40	9	3	7.5%
選心処理	47	10	5	10.6%

選心処理:20KG-60分 共存培養5日間
[0051]

* [表11] 表11 LB4404(p81121)による形質転換結果
(品種:コシヒカリ)

各種選心 処理	供試未熟胚数	圃化数	QIS発現数	形質転換効率
無処理	40	4	2	4.1%
選心処理	274	35	27	9.9%

選心処理:20KG-60分 共存培養5日間
[0052]

※ [表12] 表12 LB4404(pS8113)による形質転換結果
(品種:コシヒカリ)

各種選心 処理	供試未熟胚数	圃化数	QIS発現数	形質転換効率
無処理	63	0	—	0.0%
選心処理	291	30	23	8.2%

選心処理:20KG-60分 共存培養3日間

[0053] 実施例2

大きさ約1.2 mmのトウモロコシ未熟胚(品種A188、農林
水産省生物資源研究所より入手)を無菌的に取り出し、
LS-in液体培地で一回洗浄した。選心管に未熟胚と100
μMのアセトシンゴンを含むLS-in培地2.0 mlに約1
x 10⁶ cfu/mlの温度、Aerobacterium tumefaciens LB
A4404(pS8131) (Ishida et al. 1996(参考文献(18)))
を懸濁した液を加え、40,000G、4℃で30分間選心処理し
た。対照の未熟胚は、前記と同様の細胞懸濁液中で30分
間、室温で静置した。処理後、緩やかに攪拌した後、胚
軸面が培地に接するようにLS-AS培地に置いた。ま
た、選心処理後の未熟胚への接種は、以下の通り行っ
た。無菌的に取り出した未熟胚をLS-in液体培地で一回
洗浄した後、同液体培地を含む選心管に移し、20 ㎐ま
たは40 ㎐で4℃、30分間の選心処理を行った。対照は液
体培地中で3日間、室温で静置した。処理後、液体培地
を除き、約1 x 10⁶ cfu/mlの温度でLB4404(pS8131)を
懸濁した液を加え、緩やかに攪拌した。5分間室温で静
置した後、胚軸面が培地に接するように10 μM AgNO₃
を含むLS-AS培地に置いた。25℃、暗黒下で3日間共存
培養した後、一部の未熟胚を採取し、実施例1と同様に
x-glucによりQIS遺伝子のトランジェントな発現を観査

した。なお、上記の培地および培養法は、Ishida, Y. et
al. 1996(参考文献(18))に記載の方法に従った。
[0054] LB4404(pS8131)を接種したA188未熟胚で
のQIS遺伝子のトランジェントな発現を表13に示す。

いずれの未熟胚もQIS遺伝子の発現を示したが、対照の
未熟胚に比べ、選心処理を行った未熟胚では、より広い
範囲での発現を示すものが多く確認された。選心処理に
よる遺伝子導入部位の増大は、アグロバクテリウム菌と
ともに選心処理を行った場合、選心処理後アグロバクテ
リウム菌を接種した場合の両方で認められた。また、選
心強度及び処理時間を変えた場合でも対照に比べより広
い範囲でのQIS遺伝子の発現が認められた。

[0055] 以上の結果から、選心処理した未熟胚を選
抜培地で培養すれば、対照に比べより高い効率で、形質
転換植物の得られる可能性が示された。また、従来のア
グロバクテリウム法では形質転換できなかったA188以外
のトウモロコシ品種 (Ishida et al. 1996(参考文献(1
8))) についても選心処理することにより形質転換植物
の得られる可能性が示唆された。

[0056]

[表13] 表13 A188未熟胚でのQIS遺伝子のト
ランジェントな発現

試験 回数	処理 内容	供試 本数	出芽率の発見			
			+++	++	+	-
1	40 30	27	7	10	10	0
	別照 30	30	1	17	12	0
2	40 60	20	0	3	17	0
	20 60	20	0	10	10	0
	別照 60	20	0	1	19	0

参照は1 Gでの処理。試験はアグロバクテリウム感染下で遺伝子導入を行った。試験2は遺伝子導入後、アグロバクテリウム菌の接種を行った。

【0057】本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付与することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる。植物組織への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。

【0058】参考文献

- (1) Aldenita RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
- (2) An, G., Evert, P.R., Nitira, A. and Ha, S.B. (1989) Binary vectors. In: Gelvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A* 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
- (3) An, G., Watson, B.D., Stachel, S., Gordon, M.P. & Nester, E.R. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.*, 4:277-288.
- (4) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8711-8721.
- (5) Bidney, D., Scelone, C., Martich, J., Burns, M., Sims, L., and Hoffmann G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Mol. Biol.*, 18, 301-313.
- (6) Chilton, M.-D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P. & Nester E.R. (1974) Agrobacterium tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3672-3676
- (7) Chu, C. (1978) *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press Peking, pp.43-50
- (8) Datta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347-7351.

- (9) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/Technology*, 3, 629-635.
- (10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Britner, M., L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4803-4807.
- (11) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.
- (12) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179-180.
- (13) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1987) Virulence of Agrobacterium tumefaciens strains in A281 on lemons. *Plant Physiol*, 83, 529-534.
- (14) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) *NovAgrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.*, 2, 208-218.
- (15) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of Agrobacterium tumefaciens A281 is encoded in a region of pTi80542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.*, 168, 1291-1301.
- (16) Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction endonuclease map of pTi80542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/Technology*, 2, 702-709.
- (17) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985)

A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

- (18) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nature Biotechnology*, 14, 745-750.

(19) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology*, 3, 387-405.

- (20) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of Agrobacterium tumefaciens A281. *J. Bacteriol.*, 169, 4417-4425.

(21) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by Agrobacterium. *Plant Sci.*, 60, 223-229.

- (22) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of a double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 167-171.

(23) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Oryzodindumina* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTi80542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.

- (24) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (1986) Physical and functional map of superinfectant Agrobacterium tumefaciens tumor-inducing plasmid pTi80542. *J. Bacteriol.*, 166, 88-94.

(25) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNA for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.*, 10, 165-174.

- (26) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In: Vasil, I.K. (ed.) *Molecular Improvement of Cereals*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.

(27) Li, H.-Q., Sauter, C., Potrykus, I. and Puumäti-Kaerlas, J. (1996) Genetic transformation of *cis*-sativa (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*, 14, 736-740.

- (28) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarcane by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 87:1-13. Kluwer Academic Publishers.

(29) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture*

Manual 86:1-9. Kluwer Academic Publishers.

- (30) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15:473-497.

(31) Ohira, K., Ojima, K., Fujiwara, A. (1973) Studies on the nutritional rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.*, 14:1113-1121.

- (32) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakanura, K. (1990) Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31: 805-813.

(33) Potrykus, T., Biliang, R., Fütterer, J., Sauter, C. and Schrott, M. (1988) *Agricultural Biotechnology*, Marcel Dekker Inc., pp. 119-159.

- (34) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Method for Plant Molecular Biology*, CA: Academic Press Inc. pp.423-436.

(35) Saito, Y., Komari, T., Masura, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takamami, Y. (1992) Cucurbit mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.

- (36) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) *Plant Sci.* 41:179-183

(37) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation. *Transgenic Research* 6:329-336.

- (38) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 85:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(39) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester E.W. (1975) Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. *J. Bacteriol.*, 123, 255-264.

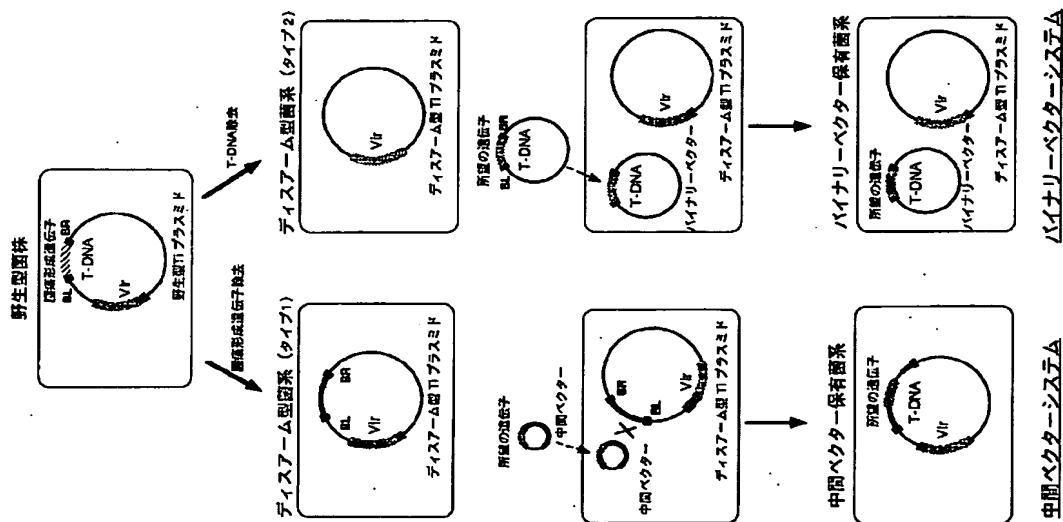
- (40) Zambryski, P., Jous, H., Genetello, C., Lesma, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.*, 2, 2143-2150.

(図面の簡単な説明)

(図1) 本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpUC23の構成方法を示す図である。

(図2) 本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpS813の遺伝子地図を示す図である。

【图3】



【图4】

